

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-214892

(43)Date of publication of application : 27.08.1996

(51)Int.Cl.	C12P 7/64 A23D 9/007 B01F 17/38 C11C 3/06
-------------	--

(21)Application number : 07-029746

(71)Applicant : OSAKA CITY  
MARUHA CORP

(22)Date of filing : 17.02.1995

(72)Inventor : TOMINAGA YOSHIO  
SUGIHARA AKIO  
SHIMADA YUJI  
MARUYAMA KAZUTERU  
SHIINA CHIKAKO  
NAKAYAMA HIDE

---

## (54) PRODUCTION OF PARTIAL GLYCERIDE CONTAINING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID

### (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject oil and fat for medicines, foods, etc., for health containing a highly unsaturated fatty acid in high concentration by reacting an oil and fat with a lipase in the presence of glycerol and carrying out the reaction while lowering temperature step by step under specific conditions.

CONSTITUTION: Oil and fat (e.g. tuna oil) is reacted with a lipase such as of *Pseudomonas fluorescens* and the reaction is carried out at 30° C for 5hr and at room temperature for 16hr and at 5° C for 24hr under stirring while step by step lowering the temperature from 30° C to 5° C to provide the objective partial glyceride containing a highly unsaturated fatty acid comprising a monoglyceride and/or a diglyceride, extremely excellent in emulsion dispersibility to water system and stability and widely utilizable for emulsifier, medicines, foods for specific health and general food, etc., because of its biological activity.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-214892

(43)公開日 平成8年(1996)8月27日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 7/64			C 12 P 7/64	
A 23 D 9/007			B 01 F 17/38	
B 01 F 17/38			C 11 C 3/06	
C 11 C 3/06			A 23 D 9/00	516

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全5頁)

(21)出願番号	特願平7-29746	(71)出願人	591030499 大阪市 大阪府大阪市北区中之島1-3-20
(22)出願日	平成7年(1995)2月17日	(71)出願人	000003274 マルハ株式会社 東京都千代田区大手町1丁目1番2号
		(72)発明者	富永 嘉男 大阪府大阪市西淀川区歌島二丁目7番2号
		(72)発明者	杉原 歌雄 兵庫県伊丹市千僧六丁目87番地
		(72)発明者	島田 福司 大阪府堺市御屋町東四丁2番31号
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高度不飽和脂肪酸含有部分グリセリドの製造方法

(57)【要約】

【構成】 油脂に、グリセリンの存在下でリバーゼを作用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行うことを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法及び高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを含んでなる乳化剤。

【効果】 本発明により、高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドが得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂に、グリセリンの存在下でリバーゼ作用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行ふことを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項2】 油脂をリバーゼで加水分解し、得られる反応生成物から高度不飽和脂肪酸高含有グリセリドを得、該グリセリドに、グリセリンの存在下でリバーゼを作用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行ふことを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項3】 油脂をリバーゼで加水分解し、得られる反応生成物から高度不飽和脂肪酸高含有グリセリドを得、該グリセリドから分画して得られるジグリセリドに、グリセリンの存在下でリバーゼを作用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行ふことを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項4】 部分グリセリドが、モノグリセリド及びノイ又是ジグリセリドである請求項1～3のいずれかの項記載の高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項5】 高度不飽和脂肪酸が、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸若しくはアラキドン酸又はこれらの組合せである請求項1～3のいずれかの項記載の高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項6】 油脂が、魚油又はオキアミ、海藻若しくは面類から抽出したものである請求項1～3のいずれかの項記載の高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法。

【請求項7】 請求項1～3のいずれかの項記載の高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法によって得られた高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを含んでなる乳化剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法及び該グリセリドの用途に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、エイコサペンタエン酸（以下「EPA」という）、ドコサヘキサエン酸（以下「DHA」という）などの高度不飽和脂肪酸は、動脈硬化症、血栓症などの成人病に対する予防効果や弱心症、学習能の増強作用など、多くの生理活性作用を有することが報告されており、医薬品、健康補助食品、特定保健用食品などの素材として注目されている。

【0003】 最近では、DHAをゼラチンカプセルに充填した健康補助食品以外にもハム、ソーセージ、ちくわ、味噌、伍詠、キャンディー、清涼飲料水などの一般

食品に添加したDHA強化食品についても數多く開発が進められている。しかし、DHA含有油脂を清涼飲料水に添加する場合は、DHA含有油脂原料がマグロ、カツオ由来の魚油等であるため、水系に乳化することが極めて困難である。このため、かなりの量の乳化剤を添加し、分散、安定化させなければならないが、乳化剤の添加量は、例えば35mlのドリンク剤に対しては約16mg（DHAとして約3.8mgが含まれるにすぎない）が限界である。これでは、生理活性を有するほどのDHA量を含めることができない。

【0004】 従つて、生理活性効果が期待できる量のDHAを清涼飲料水に添加するためには、乳化安定性に優れたDHA含有油脂を開発する必要がある。ところで、モノグリセリドが乳化作用を有することは、従来より知られており、かかるモノグリセリドの製造方法は古くから研究されている。即ち、現在では、工業的には主に油脂とグリセリンとの混合物に約0.1%の金属触媒を加え、攪拌しながら200～240℃の高温下で反応させてモノグリセリドを合成する、いわゆるグリセロリシス法が用いられている。

【0005】 しかし、上記合成法ではかなりの高温下で反応させるため、パルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸のモノグリセリドや一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸やエルシジン酸などのモノグリセリドは品質よく製造できるのに対し、DHA、EPAなどの高度不飽和脂肪酸は多くの二重結合を有するため酸化や熱による重合を受けやすく非常に不安定であることから、これらの高度不飽和脂肪酸を含むモノグリセリドは、上記のグリセロリシス法により製造することが困難である。

【0006】 そこで、最近では反応条件が温和な酵素を用いて天然油脂を加水分解し、モノグリセリドを製造する方法が注目されている。この方法では、油脂の加水分解過程において、ある程度のモノグリセリドを蓄積することは可能である。しかし、分解の進行とともにモノグリセリドも加水分解され、工業的コストに見合う十分量のモノグリセリドを製造することが困難である。

【0007】 一方、山根らは牛脂とグリセリンからなる反応混液にクロモバクテリウム属（*Chromobacterium*）及びシュードモナス属（*Pseudomonas*）などの微生物由来のリバーゼを用いてグリセロリシス反応を行うと、約70%のモノグリセリドが蓄積することを報告（JAOCS, Vol. 67, no. 11, 1990, JAOCS, Vol. 68, no. 1, 1991）しているが、DHA、EPAなどの高度不飽和脂肪酸を含有する魚油を原料としてグリセロリシス反応によつてモノグリセリドを製造できるか否かについては明らかではない。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、魚油、グリセリン及び少量の水を原料として、乳化作用にすぐれ、かつ、高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有する部分グリセ

リドの製造方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、部分グリセリドが優れた乳化力を有することに着目し、高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有する油脂を原料とした部分グリセリドの製造法について脱意研究を行った結果、油脂及びグリセリンを含む溶液にリバーゼを使用させることにより、食品に添加可能で乳化安定性に優れ、かつ、生理活性を有する高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は、油脂に、グリセリンの存在下でリバーゼを使用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行うことを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法である。さらに、本発明は、油脂をリバーゼで加水分解し、得られる反応生成物から高度不飽和脂肪酸高含有グリセリドを得、該グリセリドに、グリセリンの存在下でリバーゼを使用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行い、部分グリセリドを得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法である。

【0011】さらに、本発明は、油脂をリバーゼで加水分解し、得られる反応生成物から高度不飽和脂肪酸高含有グリセリドを得、該グリセリドから分離して得られるジグリセリドに、グリセリンの存在下でリバーゼを使用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら反応を行い、モノグリセリドを得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドの製造方法である。

【0012】ここで、部分グリセリドとは、モノグリセリド及び、又はジグリセリドであり、高度不飽和脂肪酸としてはドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸若しくはアラキドン酸又はこれらの組合せが挙げられ、油脂としては、魚油又はオキアミ、海藻若しくは菌類から抽出したものが挙げられる。さらに、本発明は、上記高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを含んでなる乳化剤である。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。本発明では、まず、魚油等の油脂、グリセリン及び少量の水を含む反応液にリバーゼを加え、30℃から5℃まで段階的に徐々に冷却しながらグリセロリシ反応を行うことによって高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを製造する。本発明での部分グリセリドとは、トリグリセリド以外のグリセリド、即ち、ジグリセリド若しくはモノグリセリド、又はジグリセリドとモノグリセリドとの混合物を意味する。また、高度不飽和脂肪酸とは、3個以上の二重結合を有する炭素数20以上の脂肪酸、例えば、アラキドン酸(20:4)、EPA(20:5)、及びDHA(22:6)などが挙げられる。

【0014】さらに、本発明での油脂とは、構成脂肪酸に高度不飽和脂肪酸を高濃度に含有し、好ましくはDHA

A 30%以上を含むものである。例えば、マグロ、カツオ、イワシ、サバ、アジ、サンマ、タラ、イカ等の魚油の他にオキアミ、さらに、クロレラ、スピルリナ等の海藻、モルティエラ属等の菌類等から抽出した油脂を挙げることができる。

【0015】したがって、高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドとは、高度不飽和脂肪酸を高濃度に構成脂肪酸として含むジグリセリド若しくはモノグリセリド又はこれらの混合物を意味するものである。本発明では、油

10 脂、グリセリン及び少量の水を含む混液を出発原料とすることができる。

【0016】本発明で用いるリバーゼは、例えばシュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物由来のリバーゼ等を用いることができる。かかるリバーゼについては、市販のものを用いることができる。例えば、シュードモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)のリバーゼ(天野製薬(株)、リバーゼAK)、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)のリバーゼ(天野製薬(株)、リバーゼP)等が挙げられる。

20 【0017】これらのリバーゼの使用形態はそのままでもよいが、固定化技術(例えば、セリートやセラミックス担体等)に固定化したリバーゼを使用してもよく、特に限界されるものではない。リバーゼの使用量は、反応条件によって適宜決定すればよく、特に制限されるものではない。例えば、油(トリグリセリド)1 molに対して、グリセリン2~5 mol加え、反応液1 g当たり20~10,000 Uのリバーゼを使用することができる。また、水分量については、例えば、油(トリグリセリド)5 gに対して10~500 μl、好ましくは10~200 μl加えることができる。

【0018】反応は、次の通り行う。すなわち、油脂に、グリセリンの存在下でリバーゼを使用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながらグリセロリシ反応により行う。この場合、まず30℃で2~10時間反応を行い、次に室温(15~25℃)で16時間反応を行う。更に得られた反応液を5℃に冷却して24~120時間反応を行う。

【0019】反応終了後の溶液から高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを抽出する。抽出は、通常の方法、40 例えば、アルカリ脱脂法、溶剤液々分配法等により行う。尚、脂質組成の分析は、例えば、ガスクロマトグラフィー、イヤトロスキャン法等により行う。DHAを高濃度含む部分グリセリドを製造するには、まず、油脂をリバーゼで適量的加水分解し、DHA高含有油脂を製造し、これをグリセリンの存在下、リバーゼを用いてグリセロリシを行う。

【0020】すなわち、油脂に、リバーゼ(例えばキヤンディダ・シリンドラシ(*Candida cylindracea*)のリバーゼ等)を作用させて30℃~40℃で15~70時間加水50 分解反応を行い、高度不飽和脂肪酸高含有グリセリドを

得る。そして、該グリセリドからジグリセリドを分画する。分画方法としては、通常の方法、例えば、シリカガルカラムクロマトグラフィー、分子蒸留、真空精密蒸留等が挙げられる。

【0021】次に、得られる高度不飽和脂肪酸高含有グリセリド又は該グリセリドから分画したジグリセリドに、グリセリンの存在下で再度リバーゼを作用させ、30℃から5℃まで段階的に温度を下げながら、前記方法と同様にしてグリセロリシス反応を行う。ここで使用するリバーゼとしては、上記加水分解用のリバーゼとは異なるリバーゼ、例えば、ショードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のリバーゼ (天野製薬(株)、リバーゼAK)、ショードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) のリバーゼ (天野製薬(株)、リバーゼP) 等を用いる。

【0022】脂質分析、脂肪酸組成の分析については、前記と同様である。一回目の加水分解により、グリセリド分画にDHAを40~50%含有するDHA高含有ジグリセリドが得られる。このジグリセリドを用いて2回目のリバーゼ反応を行うことにより、よりDHA含量の高い部分グリセリドが得られる。本発明によって生成された部分グリセリドは、反応混液からアルカリ洗浄、分子蒸留、真空精密蒸留、水蒸気蒸留、溶剤溶液分配、低温結晶化分別、クロマトグラフィー等の処理、又はこれらの処理を適宜組み合わせることによって精製分画できる。

【0023】このようにして得られた高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドは、主としてモノグリセリド及び/又はジグリセリドにより構成されており、アラキドン酸、DHA、EPAなどの高度不飽和脂肪酸を高濃度に含む。アラキドン酸、EPA及びDHA等は、循環器系及び中枢神経系機能に関与する、生体に必須の脂肪酸であるため、本発明によって製造される高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドは、医薬品、健康補助食品又は特定保健用食品として、また、部分グリセリドが非常に優れた乳化剤であるため、上記の生理活性作用を有する乳化剤として極めて有用である。

#### 【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】マグロ油 (ケン化価: 184.2, EPA: 5.8%, DHA: 23.3%) 100gとグリセリン20g(モル比で1:2)及び蒸留水5mlを含む反応系にショードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のリバーゼ (天野製薬(株)製、リバーゼAK、26,800U/g)を50,000U(ニュット)加え、攪拌しながら反応させた。反応は30℃で5時間、室温で16時間、次いで5℃で24時間行った。

【0025】得られた反応混液を適量採取し、クロマットS-II( (株) ヤトロン製) にスポットし、ベンゼ

ン: クロロホルム: 酢酸 (50:20:0.5(v/v)) の混合溶媒で展開してからイオントロスキャントH-10 (株) ヤトロン製) で脂質組成の分析を行った。その結果、脂質組成はトリグリセリド (TG) 26.1%、脂肪酸 (FFA) 6.8%、ジグリセリド (DG) 33.0%、モノグリセリド (MG) 34.1% (重量%) であった。

【0026】このように魚油トリグリセリドの約70%がモノグリセリド及びジグリセリドに変換できることわかった。得られた反応混液中の遊離脂肪酸はアルカリ脱脂酸法により水層に除去し、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドからなるグリセリド混合物90.8gを得た。グリセリド混合物中の脂肪酸組成は常法に従いメチルエチルエチル化した後、キャビラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。

【0027】その結果、EPA 5.7%、DHA 24.6%であった。得られたグリセリド混合物は、原料としたマグロ油に比べ、乳化分散性及び安定性が飛躍的に向上しており、ドリンク剤 350mlに対して、他の乳化剤を使用しなくとも60mg (DHAとして14.8mg) の添加が可能であった。この乳化剤は5℃及び25℃で60日間密封保存しても油の分散や沈殿物の生成はまったく見られなかった。尚、5℃の保存において魚臭の発臭はまったくなかつた。

【0028】【実施例2】マグロ油 (ケン化価: 184.2, EPA: 5.8%, DHA: 23.3%) 100g、水 100g及びキャンディディ・シリンドラシ (Candida cylindracea) のリバーゼ (名糖産業(株)製、リバーゼOF、360,000U/g) 0.2gからなる反応混液を攪拌しながら30℃で16時間加水分解反応を行った。加水分解後の反応液は十分平衡に達していた。

【0029】次いで、該反応液からリバーゼを含む水層を除去して加水分解油を得た。(加水分解油の酸価は13.2であった)。さらに、該加水分解油から遊離した脂肪酸をアルカリ脱脂酸法によって水層に除去し、高度不飽和脂肪酸濃縮グリセリドを33.5% (EPA 33.5%) 得た。この高度不飽和脂肪酸濃縮グリセリドの酸価は0.1であった。脂肪酸組成は、常法に従いメチルエチルエチル化した後、キャビラリーガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、構成脂肪酸中のEPAは5.1%、DHAは4.7%、8.8%であった。また、実施例1と同様にイオントロスキャントで脂質組成の分析を行った結果、トリグリセリド (TG) 85.3%、ジグリセリド (DG) 12.9%、モノグリセリド (MG) 1.8%であった。

【0030】このグリセリド混合物30gをシジカゲルカラムクロマトマトグラフィーにより3.5gジグリセリド画分を精製単離した。このジグリセリドを常法に従いメチルエチルエチル化した後、キャビラリーガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、EPAは4.1%、DHAは153.2%であった。

【0031】次に、得られたジグリセリド3gとグリセ

リン0.4g（モル比で1:1）及び蒸留水 150μlを含む反応系にシードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonasfluorescens*) のリバーゼ（天野製薬（株）製、リバーゼAK、26,800U/g）を1,500U（ユニット）加え、攪拌しながら反応させた。反応は30℃で5時間、室温で16時間、次いで5℃で24時間行った。

【0032】得られた反応混液を実施例1と同様にイヤトロスキャンで脂質組成の分析を行ったところ、脂質組成は TG 18.8%、FFA 6.5%、DG 49.0%、MG 25.7%（重量%）であった。このように、マグロ油をリバーゼで選択的加水分解して得られた高度不飽和脂肪酸高含有油脂から、シリカゲルカラムクロマグラフィーにより単離精製したジグリセリドについても、上記グリセリシス反応により約25%モノグリセリド（MG）に変換させられることができた。

【0033】得られた反応混液中の遊離脂肪酸はアルカリ脱酸法により水層に除去し、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドからなるグリセリド混合物2.8gを得た。グリセリド混合物中の脂肪酸組成は、常法に従

いメチルエステル化した後、キャビラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。

【0034】その結果、EPA 4.5%、DHA 53.8%であった。得られたグリセリド混合物は、原料としたマグロ油に比べ、乳化分散性及び安定性が飛躍的に向上しており、ドリンク剤 350mlに対して他の乳化剤を使用しなくて60mg（DHAとして32.5mg）の添加が可能であった。この乳化剤は5℃及び25℃で60日間密封保存しても油の分散や沈澱物の生成はまったく見られなかった。

10 尚、5℃の保存において魚臭の発臭はまったくなかつた。

#### 【0035】

【発明の効果】本発明により、高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを効率的に製造する方法を提供することができる。水系への乳化分散性及び安定性が極めて優れ、かつ、生理活性を有する高度不飽和脂肪酸高含有部分グリセリドを効率良く製造できることは、医薬品、化粧品、特定保健用食品及び一般食品などに幅広く利用することができるであり、産業上極めて有用である。

---

#### フロントページの続き

(72)発明者 丸山 一輝

茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社中央研究所内

(72)発明者 椎名 智香子

茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社中央研究所内

(72)発明者 中山 秀

茨城県つくば市和台16番2 マルハ株式会社中央研究所内